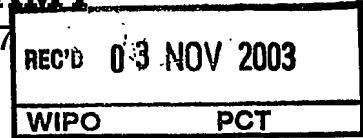




ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1200 Wien, Dresdner Straße 87



Kanzleigebühr € 37,00
Schriftengebühr € 130,00

PCT/EP03/ 8933

Aktenzeichen A 1216/2002

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma IGENEON KREBS-IMMUNTHERAPIE FORSCHUNGS- UND
ENTWICKLUNGS-AG
in A-1230 Wien, Brunner Straße 59,**

am **12. August 2002** eine Patentanmeldung betreffend

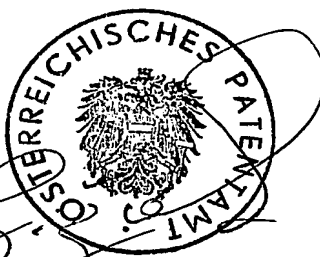
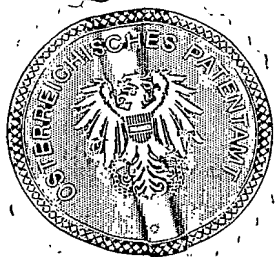
"Set zur Behandlung von Krebspatienten",

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnung mit
der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung samt Zeichnung übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt
Wien, am 20. August 2003

Der Präsident:

i. A.



K. BRUNŽAK

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

A1216/2002

Urtext

R 40186

(51) Int. Cl.:

AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(73) Patentinhaber: IGENEON KREBS-IMMUNTHERAPIE
FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGS-
AG Wien (AT)

(54) Titel: Set zur Behandlung von Krebspatienten

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(66) Umwandlung von GM /

(62) gesonderte Anmeldung aus (Teilung): A

(30) Priorität(en):

(72) Erfinder:

(22) (21) Anmeldetag, Aktenzeichen: 12. AUG. 2002 , A /

(60) Abhängigkeit:

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgabetag:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht
gezogen wurden:

1/1

Die Erfindung betrifft ein Set zur kombinierten Anwendung für die Behandlung von Krebspatienten, sowie dessen diagnostische Verwendung.

Krebs ist eine weit verbreitete Krankheit und verläuft in vielen Fällen tödlich. Die Krebstherapie umfasst üblicherweise die Entfernung eines soliden Tumors und eine weitere Behandlung, die Metastasen verhindern bzw. reduzieren soll. Zu den Standardtherapien zählen neben der Chirurgie noch die Chemotherapie und Bestrahlungstherapie. Trotz der umfassenden Therapie, die oft mit schweren Nebenwirkungen einher geht, ist der Behandlungserfolg ungenügend. Am häufigsten treten Krebsformen mit epithelialen Tumoren auf, die unter anderem Brust, Magen, Darm, Pankreas, Lunge, Prostata und Eierstock betreffen. Die Rückfallsrate bei Darmkrebs liegt bei etwa 45%. Metastatischer epithelialer Krebs gilt nahezu als unheilbar. Es gilt daher bei der Behandlung von Krebspatienten die Metastasenbildung zu verhindern bzw. zu reduzieren.

Tumorzellen können von Primärtumoren in Körperflüssigkeiten und anderen Organen disseminieren. Diese disseminierten Tumorzellen können sich im Ruhezustand befinden und sind durch eine Chemotherapie (Radiotherapie) oft nicht angreifbar. Ein derartig behandelter Patient befindet sich scheinbar in einem geheilten Zustand, welcher auch als „minimal residual disease“ beschrieben ist. Ruhende Tumorzellen haben jedoch ein Potential zur Metastasenbildung, wenn sie zu wachsenden und metastasierenden Zellen werden.

Die Immuntherapie stellt eine innovative Behandlungsmöglichkeit von Krebspatienten dar. Sowohl aktive als auch passive Immuntherapie sind anerkannte Maßnahmen zur Unterstützung des Immunsystems.

Das adaptive Immunsystem des Menschen besteht aus zwei wesentlichen Komponenten, der humoralen und der zellulären Immunität. Die adaptive Immunantwort beruht zum Teil auf der klonalen Selektion von B- und T-Lymphozyten und erlaubt im Prinzip die Erkennung jedes beliebigen Antigens sowie den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses. Diese Merkmale des adaptiven Immunsystems werden

generell bei Impfungen nutzbringend angesprochen.

Jede B-Zelle produziert einen Antikörper mit bestimmter Bindungsspezifität. Dieser Antikörper befindet sich als spezifischer Rezeptor auch in der Membran der ihn produzierenden B-Zelle. Die humorale Immunantwort gegen als fremd erkannte Antigene beruht auf der selektiven Aktivierung derjenigen B-Zellen, die solche Antikörper produzieren, die an Epitope des jeweiligen Antigens binden können. Für die Antikörpervielfalt spielen DNA-Rearrangements im Verlauf der B-Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, in das Immunsystem einzugreifen. Ein Ansatz, Tumorzellen relativ spezifisch zu zerstören, ist die passive Immuntherapie mit Antikörpern, die gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) gerichtet sind (Immunology Today (2000), 21:403-410; Curr. Opin. Immunol. (1997), 9:717). Ein anderer Ansatz, Tumorzellen zu zerstören, ist eine aktive Impfung, die eine Immunantwort gegen TAA auslöst. Diese Immunantwort ist somit auch gegen die entsprechenden Tumorzellen gerichtet (Ann. Med. (1999), 31:66; Immunobiol. (1999), 201:1).

1. Passive Antikörpertherapie:

Für therapeutische Zwecke ist es möglich, Antikörper, die notwendig sind, um eine bestimmte Funktion innerhalb eines Organismus zu erfüllen, diesem Organismus zuzuführen. Diese Art der Anwendung wird passive Immuntherapie genannt und kann bei verschiedenen medizinischen Indikationen eingesetzt werden, z.B. bei Krebs-Immuntherapie (Immunol. Today (2000), 21:403), Vergiftungen (Toxicon (1998), 36:823; Therapie (1994), 49:41) und Infektionen (Clin. Infect. Dis. (1995), 21:150). In diesen Fällen können Antikörper eingesetzt werden, die entweder aus entsprechend immunisierten Tieren stammen oder über Immortalisierung von Immunglobulin-Genen durch verschiedene biologische oder molekularbiologische Techniken aus Zellen gewonnen werden können (z.B. Hybridoma-Technik, Phage-Display-Technik, etc.).

2. Aktive Immunisierung:

Zur Modulation des Immunsystems kann man mit Antigenen immunisieren. Antigene sind Moleküle, Molekül-Komplexe oder ganze Organismen, an welche Antikörper binden können. Nicht alle Antigene rufen eine Immunantwort hervor, d.h. nicht alle Antigene sind immunogen. Bestimmte kleine Moleküle werden vom Immunsystem nicht registriert (Haptene), solche kleinere Moleküle kann man dem Immunsystem in geeigneter Form präsentieren und sie dadurch immunogen machen. Eine derartige Methode ist die Kopplung des Haptens an ein immunogenes Molekül, ein sogenanntes "Trägermolekül". Zur aktiven Immunisierung können auch Antikörper-Präparate eingesetzt werden, wie in der EP 1140168 beschrieben.

Tumorzellen können durch das Immunsystem nur bedingt angegriffen werden, da sie sich von normalen Zellen kaum unterscheiden und daher spezifische Antikörper fehlen. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit der Identifizierung geeigneter Targets, also Zielantigene, zur Herstellung von Tumor-spezifischen Antikörpern. Die Immuntherapie zur Behandlung von Krebs umfasst dann entweder die passive Therapie durch die direkte Verabreichung der spezifischen Antikörper oder die aktive Impfung mit geeigneten Antigen-Targets zur Stimulierung des Immunsystems und Generierung der spezifischen Antikörper in vivo.

Bestimmte TAA werden als relevante „targets“ zur Entwicklung von immuntherapeutischen Mitteln zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Krebs definiert. TAA sind Strukturen, die bevorzugt auf der Zellmembran von Tumorzellen exprimiert sind, dadurch eine Unterscheidung zu nicht-malignem Gewebe ermöglichen und daher als Zielpunkte für diagnostische und therapeutische Anwendungen von spezifischen Antikörpern gesehen werden.

Krebszellen haben praktisch immer, neben anderen physiologischen Eigenheiten, die sie von normalen Zellen unterscheiden, eine veränderte Art der Glykosylierung (Glycoconj. J. (1997), 14:569; Adv. Cancer Res. (1989), 52:257; Cancer Res. (1996), 56:5309). Obwohl die Veränderungen von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sind, kann man feststellen, dass eine aberrante Glykosylierung typisch für Krebszellen ist. In den meisten Fällen wird die ver-

änderte Glykosylierung an der Oberfläche der Zellen in Form von Glykoproteinen und Glykolipiden präsentiert. Diese veränderten Zuckerstrukturen können daher als TAA bezeichnet werden, die in vielen Fällen ausreichend genug tumorspezifisch sind, d.h. sie kommen in "normalen" Zellen selten vor. In vielen Fällen erzeugen die Zellen, und auch die Tumorzellen keine einheitliche Glykosylierung, d.h. es existieren verschiedene Glykoformen von komplexen Glycan-Ketten auf einer Zelle (Annu. Rev. Biochem. (1988), 57:785).

Im Verlauf der Entdeckung und nachfolgenden Charakterisierung von verschiedenen TAA hat sich herausgestellt, dass diese oft wichtige Funktionen für Krebszellen haben. Sie ermöglichen den entarteten Zellen, charakteristische Eigenschaften für den malignen Phänotyp wie z.B. vermehrte Adhäsionsfähigkeit oder vermehrte Aufnahme von Wachstumsfaktoren auszuüben, die für die Etablierung von Metastasen von großer Bedeutung sind. Allerdings können solche Antigene durchaus in bestimmten Stadien auch auf normalen Zellen exprimiert sein, wo sie für normale Funktionen dieser Zellen verantwortlich sind. Ein Beispiel dafür ist das Lewis Y Kohlenhydratantigen, das auf der Mehrzahl der Tumoren epithelialen Ursprungs aufscheint, aber auch während der fötalen Entwicklung epithelialer Gewebe eine wichtige Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass die Expression dieses Antigens in Lungenkrebs mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist, da Lewis Y positive Krebszellen offensichtlich ein höheres metastatisches Potential haben (N. Engl. J. Med. 327 (1992), 14).

In der EP 0 528 767 ist die Verwendung eines humanisierten anti-Lewis Y-Antikörpers zur Behandlung von epitheliale Krebs beschrieben.

Unter den weiter bekannten Tumor-assoziierten Kohlenhydratstrukturen finden sich z.B. alle Lewis-Antigene, die verstärkt in vielen epithelialen Krebsarten exprimiert werden. Dazu gehören neben Lewis y-Strukturen auch Lewis x- und Lewis b- Strukturen, sowie sialylierte Lewis x-Strukturen. Andere Kohlenhydrat-Antigene sind GloboH-Strukturen, KH1, Tn-Antigen, TF-Antigen und das alpha-1,3-Galactosyl-Epitop (Elektrophoresis (1999), 20:362; Curr. Pharmaceutical Design (2000), 6:485, Neoplasma (1996),

43:285).

Andere TAA sind Proteine, die von Krebszellen besonders stark exprimiert werden, wie z.B. CEA, TAG-72, MUC1, Folate Binding Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, etc. (Sem. Cancer Biol. (1995), 6:321). Relevante TAA sind oftmals Oberflächenantigene von epithelialen Zellen, die vermehrt in wachsenden Zellen, wie fötalem Gewebe, und auch an Tumorgewebe auftreten. Eine spezielle Gruppe von TAA sind an den Adhäsionsprozessen der epithelialen Zellen beteiligt. Zu den zellulären Adhäsionsproteinen, die auf Tumorzellen überexprimiert werden, zählen EpCAM, NCAM und CEA.

In der österreichischen Anmeldung A 744/2002 ist ein immunogener Antikörper mit mindestens zwei verschiedenen Epitopen eines TAA beschrieben. Ein bevorzugter Antikörper weist mindestens ein Epitop von EpCAM und ein Epitop von Lewis Y auf.

Gemäß Allergol. et Immunopathol 25, 4 (176-81), 1997 wird das MUC-1 Genproduct, das polymorphe epitheliale Mucin, und die Entwicklung von spezifischen monoklonalen Antikörpern beschrieben. Als Target für das TAA Mucin wird sowohl die Peptidsequenz als auch spezifische Kohlenhydrate untersucht.

Direkte therapeutische Anwendungen von Antikörpern gegen TAA beruhen auf passiven Immuntherapien, das heißt, ein spezifischer Antikörper wird systemisch in geeigneter Menge an Krebspatienten verabreicht und übt eine immuntherapeutische Wirkung aus. Die biologische Halbwertszeit solcher Agenzien hängt von ihrer Struktur ab und ist begrenzt. Daher ist es notwendig, wiederholte Applikationen vorzunehmen. Das kann bei Verwendung von xenogenen Antikörpern (z.B. murine monoklonale Antikörper, MAK) aber zu unerwünschten Immunreaktionen führen, die eine mögliche therapeutische Wirkung neutralisieren und gefährliche Nebenwirkungen (anaphylaktische Reaktionen) bedingen können. Daher können solche Immuntherapeutika nur für eine begrenzte Zeit verabreicht werden.

Eine bessere Verträglichkeit wird durch Reduktion der xenogenen Strukturen des Antikörpers und dem Einbau von menschlichen

Strukturen erzielt, beispielsweise mit chimären oder humanisierten Antikörpern. Es werden auch Systeme zur Herstellung spezifischer humaner Antikörper entwickelt. So können bestimmte Zelllinien, Organismen oder transgene Tiere gemäß Stand der Technik humane Antikörper produzieren.

Gemäß der WO0142796 werden Gewebeproben solider Tumoren zur verbesserten biologischen Untersuchung präpariert. Dabei werden sogenannte „microarrays“, also gleichartige Felder von Tumorgewebe in konservierter Form hergestellt, welche in mikroskopischen Reihenuntersuchungen für histopathologische und immunhistochemische Befunde herangezogen werden.

Die Erfindung stellt sich zur Aufgabe, die immuntherapeutische Behandlung von Krebspatienten durch die Auswahl geeigneter Zielantigene und die begleitende Diagnostik zu verbessern.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Ansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß wird ein Set zur Verfügung gestellt, welches zur kombinierten Anwendung für die Behandlung von Krebspatienten geeignet ist. Das Set umfasst die Komponenten

- a) ein Antigen eines zellulären Oberflächenproteins, oder einen Antikörper gerichtet gegen das zelluläre Oberflächenprotein, und
- b) ein Antigen einer aberranten Glykosilierung, oder einen Antikörper gerichtet gegen die aberrante Glykosilierung.

Krebszellen haben - wie erwähnt - praktisch immer, neben anderen physiologischen Eigenheiten, die sie von normalen Zellen des jeweiligen Gewebes unterscheiden, eine veränderte Art der Glykosylierung (Glycoconj. J. (1997), 14:569; Adv. Cancer Res. (1989), 52:257; Cancer Res. (1996), 56:5309). Obwohl die Veränderungen von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sind, kann man feststellen, dass eine aberrante Glykosylierung typisch für Krebszellen ist (verglichen mit den entsprechenden normalen Zellen in diesem Gewebe). In den meisten Fällen wird die veränderte Glykosylierung an der Oberfläche der Zellen in Form von Glykoproteinen und Glykolipiden präsentiert. Diese veränderten Zuckerstrukturen können



Die Zielantigene der Komponente a) stellen vorzugsweise mindestens ein Epitop eines zellulären Adhäsionsproteins dar, und sind bevorzugt aus den homophilen Adhäsionsproteinen epithelialer Tumorzellen ausgewählt. Diese haben die Eigenschaften, dass sie an die gleichen Oberflächenproteine anderer Tumorzellen binden können und somit ein Zellagglomerat bilden können. Dazu zählen Antigene, die insbesondere vom EpCAM-Antigen abgeleitet sind, das EpCAM Molekül selbst bzw. Epitope, Teile oder Mimiks davon. Ein besonders gutes Immunogen für die aktive Immunisierung mit einem Antigen der Komponente a) ist ein immunogener Antikörper, wie in der EP 1140168 B1 beschrieben. Weitere besonders bevorzugte Antigene zellulärer Adhäsionsproteine sind entweder von NCAM und CEA abgeleitet.

Gemäß einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen der Komponente a) mit mindestens einem Epitop eines Oberflächenrezeptors ausgestattet, insbesondere eines Rezeptormoleküls ausgewählt aus der Gruppe der EGF-Rezeptorfamilie, darunter den EGF-Rezeptor und Her-2/neu Rezeptor, CD55-Rezeptor, Transferrinrezeptor und P-Glycoprotein. Darüberhinaus sind aber auch Antigene mit Epitopen eines Mucins, insbesondere MUC1, oder CA125 erfindungsgemäß verwendbar.

Unter den für die Komponente a) relevanten Epitopen findet sich vorzugsweise mindestens ein Epitop eines humanen Antigens ausgewählt aus der Gruppe der Peptide oder Proteine mit regulativer Funktion für zelluläre Adhäsionsprozesse und Rezeptorfunktionen. Dazu zählen neben den bereits erwähnten Antigenen insbesondere auch T-Zell Peptide, welche vorzugsweise von den TAA abgeleitet sind.

Ein Antigen der Komponente b) des erfindungsgemäßen Sets ist auf die Immuntherapie gegen ein Epitop eines Kohlenhydrats ausgerichtet. Erfindungsgemäß bevorzugte Kohlenhydrat-Epitope sind Tumor-assoziierte, aberrante Kohlenhydratstrukturen, wie die Lewis-Antigene, z.B. Lewis x-, Lewis b- und Lewis y-Strukturen, sowie sialylierte Lewis x-Strukturen. Weiters sind auch GloboH-Strukturen, KH1, Tn-Antigen, TF-Antigen, das alpha-1-3, Galactosyl-Epitop bevorzugte Kohlenhydrat-Antigen-Strukturen im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

Ein besonders gutes Target für die Komponente b) ist das Lewis Y-Antigen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung eines humanisierten Antikörpers, wie in der EP 0 528 767 beschrieben. Dieser Antikörper erkennt Lewis Y-Antigen an Tumorzellen bzw. Oberflächenrezeptoren von Tumorzellen und ist für die passive Immuntherapie geeignet.

Es hat sich herausgestellt, dass die Oberflächenrezeptoren einer Tumorzelle mit einer aberranten Glykosilierung ausgestattet sind und relevante Epitope im Sinne der Erfindung ausbilden. Dies betrifft vor allem die Familie der EGF-Rezeptoren, darunter den EGF-Rezeptor oder Her-2/neu Rezeptor. Die erfindungsgemäße Kombination der Zielantigene, die von diesen Glykoproteinen stammen,

eventuell mit weiteren Antigenen der aberranten Glykosilierung ist daher besonders bevorzugt.

Durch die Immuntherapie mit dem Target der aberranten Glykosilierung werden gleichsam alle Tumor - spezifischen Rezeptoren, die durch diese aberrante Glykosilierung charakterisiert sind, blockiert. Darunter sind etwa alle Rezeptoren der EGF-Rezeptorfamilie, der CD55 (791Tgp72/DAF - decay accelerating factor) - Rezeptor, der Transferrinrezeptor und das P-Glycoprotein.

Es hat sich auch herausgestellt, dass Antikörper, die gegen eine aberrante Glykosilierung gerichtet sind, in funktioneller Weise an mehrere Rezeptoren der Familie der EGF-Rezeptoren binden und damit die Signalkaskade zur Induktion des Zellwachstums effektiv blockiert werden kann. Es konnte in der österreichischen Anmeldung A 995/2002 gezeigt werden, dass insbesondere die erk1 und erk2 - Isoformen der MAP-Kinase funktionell durch die erfindungsgemäß verwendeten Antikörper gebunden werden können. Die Bindung der Wachstumsfaktoren an die Rezeptoren wurde dadurch verhindert bzw. reduziert. Diese Behandlung ist im Vergleich zur Immuntherapie mit Antikörpern gegen den proteinären extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors spezifischer, da die ungewöhnlichen Tumor-assoziierten Kohlenhydratstrukturen auf EGF-Rezeptoren von normalen Zellen fehlen. Andererseits ist die Behandlung universeller, da gleichzeitig verschiedene Rezeptoren mit gleicher aberranter Glykosilierung blockiert werden.

Durch den erfindungsgemäßen Einsatz der Immuntherapie gerichtet gegen eine aberrante Glykosilierung wird somit auch die mitogene Stimulierung einer Krebszelle durch EGF oder Heregulin verhindert. Die spezifische Bindung der Antikörper an eine Tumor-assoziierte Glykosilierung von Krebszellen blockiert die Interaktion der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren mit deren physiologischen Liganden und hemmt die Signaltransduktion durch diese Rezeptoren und damit das Zellwachstum.

Gleichzeitig kann ein solcher Antikörper durch seine Wirkung innerhalb des humoralen und zellulären Immunsystems die Tumorzelle spezifisch angreifen. Tumorzellen, die den EGF-Rezeptor bzw. Rezeptoren der EGF-Rezeptor Familie exprimieren, werden erfin-

dungsgemäß spezifisch gebunden und können lysiert werden.

Die besonders bevorzugte erfindungsgemäße Kombination der Zielantigene betrifft ein Epitop des EpCAM-Moleküls oder des Her-2/neu Rezeptors für die Komponente a) und ein Epitop des Lewis Y Moleküls für die Komponente b).

Die Zielantigene sind durch die spezifische Immuntherapie entweder direkt betroffen oder indirekt durch die Bindung von TAA, die eine Funktion der Zielantigene wesentlich beeinträchtigen. Zielantigene umfassen insbesondere Epitope proteinärer Antigene, Glykoproteine oder Kohlenhydratantigene. In der Regel ist davon auszugehen, dass unter einem proteinären Antigen ein Polypeptid von mindestens fünf Aminosäuren zu verstehen ist.

Bevorzugte Epitope sind von Antigenen abgeleitet, die spezifisch für epitheliale Tumoren sind und etwa vermehrt bei Brustkrebs, Krebs des Magen und Darms, der Prostata, Pankreas, Ovarien und der Lunge vorkommen. Unter den bevorzugten Epitopen sind diejenigen zu finden, welche vor allem eine humorale Immunantwort, also eine spezifische Antikörperbildung in vivo hervorrufen. Andererseits können auch diejenigen Antigene als Epitope im Sinne der Erfindung ausgewählt werden, welche eine T-Zell spezifische Immunantwort generieren. Darunter sind vor allem auch intrazelluläre Strukturen bzw. T-Zell Peptide zu finden. Geeignete Epitope werden zumindest in 20%, vorzugsweise mindestens in 30% der Fälle von Tumorzellen einer bestimmten Krebsart exprimiert, weiter bevorzugt in zumindest 40%, insbesondere in zumindest 50% der Patienten.

Verfahren zur Auffindung geeigneter antigener Strukturen, Modellierung und Herstellung der von TAA abgeleiteten Peptide, Polypeptide oder Proteine bzw. dafür kodierende Nukleinsäuren, weiter Lipoproteine, Glycolipide, Kohlenhydrate oder Lipide sind dem Fachmann bekannt und können ohne unzumutbaren experimentellen Aufwand für die jeweilige Tumor-spezifische Struktur zur Verfügung gestellt werden. Ebenso bekannt sind Verfahren zur Konjugierung oder Derivatisierung derartiger Strukturen, welche erfindungsgemäß ebenso geeignet sind. Weiter sind die Verfahren zur Herstellung der spezifischen Antikörpern bekannt, die erfin-

dungsgemäß geeignet sind.

Zur Selektion geeigneter antigener Strukturen bzw. entsprechender Antikörper oder Immunkomplexe wird erfindungsgemäß ein geeignetes Antigen und/oder ein entsprechender Antikörper durch ein immunologisches Screening-Verfahren selektiert. Das erfindungsgemäße Verfahren zur immunologischen Selektion eines Tumor-spezifischen Zielantigens oder von Antikörpern gerichtet gegen das Zielantigen bedient sich eines diagnostischen Mittels. Diese Mittel enthält erfindungsgemäß die Wirksubstanzen der genannten Komponenten a) und b), die beide mit einem immuntherapeutischen Kandidaten gleichzeitig oder unabhängig voneinander Immunkomplexe bilden.

Das Screening kann mit Hilfe bekannter Methoden, darunter „phage display“ Methoden und Hybridomatechnologie, und den Immunreagenzien entsprechend der Komponenten a) und b) oder auch mit qualitativen oder präparativen Methoden zur selektiven Bindung der Kandidaten-Antigene an die Immunreagenzien durchgeführt werden. Ein entsprechendes Screening macht erstmals auch die Selektion und Präparation eines Neoepitopes möglich, das erst durch die Glykosilierung eines Antigens der Komponente a) mit einer Kohlenhydratstruktur der Komponente b) entsteht. Es hat sich herausgestellt, dass dieses Neoepitop dann von Tumorzellen exprimiert wird, wenn ein Krebspatient eine unverhältnismäßig schlechte Prognose hat. Erfindungsgemäß ist es nun erstmals möglich, mit Hilfe eines Screening-Verfahrens die Tumor-spezifischen und relevanten Neoepitope zu finden, und entsprechende Immuntherapien zu entwickeln. Nach Charakterisierung des Neoepitopes können geeignete Antikörperpräparationen hergestellt werden, die gerade diese Neoepitope erkennen, und vorzugsweise eine oder beide der einzelnen Antigene der Komponenten a) und b) nicht erkennen. Die Immuntherapie mit dem Target des Neoepitopes ist insofern verbessert, dass epitheliale Zellen von normalem Gewebe nicht betroffen sind, sondern lediglich die Tumorzellen.

Beispiele für solche Neoepitope sind die Epitope, die durch die Glykosilierung eines EpCAM Proteins oder eines Her-2/neu Rezeptors mit Lewis Y-Kohlenhydrat oder entsprechende sialylierte Glykoproteine ausgebildet werden. Wenn Antikörper mit einer Spezifität für diese Neoepitope hergestellt und präpariert wer-

den, so binden diese vorzugsweise nicht an die deglykosilierten Proteine. Gerade diese Antikörper werden vorzugsweise als monoklonale Antikörper für die passive Immuntherapie vorgeschlagen, um unspezifische Wechselwirkungen und Nebenwirkungen zu vermeiden. Die Identifizierung der Neoepitope kann auch als Grundlage für die Entwicklung von Impfantigenen sein, indem ein Immunogen mit genau diesem Epitop präsentiert wird. Dieses Epitop oder ein Abbild (Mimik) des Epitopes kann ohne weiteres aus entsprechenden Peptid-Libraries oder auch als Derivat, z.B. als Fragment, eines natürlicherweise vorkommenden Antigens hergestellt werden. Aufgrund des selektierten Neoepitopes ist dann eine Präparation eines Antigens erhältlich, die genau dieses Neoepitop oder dessen Mimik aufweist. Derartige Antigen-Präparationen sind wertvolle Wirksubstanzen für die aktive Immunisierung von Krebspatienten oder auch für als diagnostisches Präparat einsetzbar.

Erfindungsgemäß wird etwa eine Tumorzelllinie, die einen Lewis Y glykosilierten Her-2/neu Rezeptor exprimiert, zur Herstellung entsprechender Antikörper herangezogen. Durch ein Auswahlverfahren unter Zuhilfenahme der einzelnen Immunreagenzien Lewis Y, Her-2/neu und einem synthetischen Lewis Y glykosilierten Her-2/neu werden dann diejenigen Antikörper gewonnen, die nur an das Kombinationsantigen binden, nicht aber an eines der separaten Antigene. Diese Antikörper waren Grundlage für die Entwicklung der Neoepitop-spezifischen monoklonalen Antikörper.

Erfindungsgemäß können aus immunisierten Mäusen Hybridoma gewonnen werden, wobei die Auswahl der positiven Klone durch ein Differentialscreening mit den Komponenten des erfindungsgemäßen Sets erfolgt. Ein Neoepitop kann dann durch ein übliches Epitop-„mapping“ Verfahren dadurch identifiziert werden, dass die spezifischen Antikörper an das glykosilierte Oberflächenprotein binden, nicht aber an die einzelnen Komponenten a) oder b). Aus einem positiven Klon kann dann ein anti-Neoepitop monoklonaler Antikörper erhalten werden. Ein Präparat eines solchen Antikörpers ist etwa für die passive Immuntherapie oder für die diagnostische Verwendung geeignet.

In einer besonderen Ausführungsform wird für mindestens eine der Komponenten a) und b) ein Antikörpermisch verschiedener Anti-

körper mit Spezifität für eines oder mehrere der Antigene aus a) oder b) zur Verfügung gestellt. Insbesondere können Antikörpergemische als repräsentative Auswahl („panel“) mit Spezifität für zumindest zwei gleiche oder verschiedene Epitope eines Adhäsionsproteins, wie EpCAM, oder eine aberranten Glykosilierung, z.B. der Lewis Kohlenhydratantigene, zur Verfügung gestellt werden.

Erfindungsgemäß wird die Immuntherapie mit einer pharmazeutischen Präparation vorgenommen, die entweder beide Komponenten, also Antigene und/oder Antikörper des Sets gemeinsam oder als getrennte Präparationen in pharmazeutisch akzeptabler Form beinhalten. Ein erfindungsgemäßes Set enthält also vorzugsweise die Komponenten a) und b) in jeweils einer oder einer einzigen pharmazeutischen Präparation, die zur Immuntherapie geeignet ist.

Das erfindungsgemäße Set kann sowohl zur aktiven als auch zur passiven bzw. zur Kombination der aktiven und passiven Immuntherapie verwendet werden. Dementsprechend werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparationen bzw. deren Komponenten vorzugsweise als Vakzine und/oder als intravenös verträgliches Präparat formuliert.

Ein für die passive Immuntherapie erfindungsgemäß verwendetes Arzneimittel liegt vorteilhafterweise in einer geeigneten Formulierung vor. Bevorzugt sind solche Formulierungen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger. Dieser umfasst beispielsweise Hilfsstoffe, Puffer, Salze und Konservierungsmittel. Vorzugsweise wird eine fertige Infusionslösung zur Verfügung gestellt.

Nachdem ein Antikörper relativ stabil ist, haben Arzneimittel auf Basis von Antikörpern oder deren Derivate den wesentlichen Vorteil, dass sie als lagerstabile Lösung bzw. Formulierung in einer gebrauchsfertigen Form „ready-to-use“ in den Verkehr gebracht werden können. Diese ist bevorzugt bei Kühlschranktemperaturen bis zu Raumtemperatur in der Formulierung lagerstabil. Das für die intravenöse Verabreichung formulierte Arzneimittel kann aber auch in gefrorener oder lyophilisierter Form gelagert werden, die bei Bedarf aufgetaut bzw. rekonstituiert werden kann.

Zur passiven Immuntherapie und damit zur Bindung der relevanten

Oberflächenantigene an Tumorzellen wird üblicherweise eine hohe Dosis von mindestens 50 mg, vorzugsweise mindestens 100 mg, am meisten bevorzugt mindestens 200 mg pro Patient verabreicht. Die maximale Dosis ist durch die Verträglichkeit des Antikörpers limitiert, und richtet sich nach dessen Spezifität und Avidität. Humanisierte Antikörper bzw. humane Antikörper sind am besten verträglich. Eine Dosis bis zu 1 g oder in einigen Fällen bis zu 2 g pro Patient und Behandlung kann durchaus vorteilhaft sein.

Die übliche Behandlung zu passiven Immuntherapie umfasst mehrmalige Infusionen in regelmäßigen Abständen, etwa wöchentlich für einen Zeitraum von 6-24 Wochen, mit einer Dosis im Bereich von 1 bis 10 mg/kg, vorzugsweise im Bereich von 2 bis 6 mg/kg. Ein Antikörper-Präparat kann auch lokal, also zum Tumorgewebe und/oder intraoperativ in den Wundbereich nach Entfernung eines Tumors, verabreicht werden. Verschiedene Verabreichungsarten können auch sinnvollerweise kombiniert werden, etwa eine i.v. Infusion kurz vor einer Operation, sowie eine lokale Dosis direkt in den Wundbereich während der Operation. Praktische Applikationsformen für die lokalisierte Verabreichung umfassen beispielsweise fertige „ready to use“ Applikatoren, etwa Katheter, Spritzen oder Sprays, geeignet zur Verteilung von Flüssigarzneimitteln.

Die i.v. Behandlung wird vorzugsweise in bestimmten Zeitabständen wiederholt, entsprechend der Halbwertszeit des verwendeten Antikörpers, die üblicherweise im Bereich von 5 bis 30 Tagen liegt. Durch besondere Derivatisierung des Antikörpers ist es möglich, die Halbwertszeit auf bis zu mehrere Monate zu verlängern und dadurch die Behandlungsintervalle entsprechend zu verlängern.

Die Konzentration des Arzneimittelwirkstoffes richtet sich nach dessen Verträglichkeit. Dabei kann ein besonders verträgliches Präparat auf Basis eines humanisierten Antikörpers in hoher Konzentration direkt ohne weitere Verdünnung an den Patienten verabreicht werden. Durch die bevorzugte Konzentration im Bereich von 0.1% bis 10%, vorzugsweise von 1%-5%, ist es möglich, das verabreichte Volumen und die entsprechende Infusionszeit gering zu halten. Eine erfindungsgemäß eingesetzte Antikörperlösung kann als Bolus-Injektion einer konzentrierten Lösung oder auch in verdünnter Form intravenös verabreicht werden. Das Arzneimit-

tel kann etwa 1:10 bis 1:100 fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden, um ein Infusionpräparat herzustellen.

Unter dem Begriff "Antikörper" werden Antikörper aller Art verstanden, insbesondere monospezifische oder polyspezifische, monoklonale Antikörper, oder auch chemisch, biochemisch oder molekularbiologisch hergestellte Antikörper, oder polyklonale Antikörper mit einer bestimmten Spezifität, etwa ein Immuneserum oder eine Fraktion eines Immuneserums.

Ein erfindungsgemäß eingesetzter Antikörper ist vorzugsweise einen nativer, also ein funktionell aktiver Antikörper. Dieser Antikörper ist vorzugsweise nicht mit einem Label oder anderen Detektionsmitteln behaftet, um die Funktionalität nicht zu beeinträchtigen. Native Antikörper besitzen die Eigenschaften der natürlicherweise in Patienten vorkommenden Antikörper. Native Antikörper sind heterotetramere Glykoproteine, die aus zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten zusammengesetzt sind.

Es kann aber auch ein Antikörper-Derivat eingesetzt werden, das bevorzugt aus der Gruppe der Antikörper-Fragmente, -Konjugate, Homologe oder Derivate ausgewählt ist, aber auch Komplexe mit zusätzlichen Effektor-Funktionen. Jedenfalls ist es bevorzugt, dass das Antikörper-Derivat zumindest Teile des Fab-Fragmentes enthält, bevorzugt gemeinsam mit zumindest Teile des $F(ab')_2$ Fragmentes, und/oder Teile der hinge Region und/oder des Fc-Teils eines λ oder κ Antikörpers.

Weiter kann auch ein einkettiges Antikörper-Derivat, etwa ein sogenannter „single chain“ Antikörper mit Effektorfunktionen im Sinne der Erfindung herangezogen werden. Ein erfindungsgemäß eingesetzter Antikörper ist vorzugsweise von der Art eines Immunglobulins, etwa eines IgG, IgM, IgA oder IgD.

Erfindungsgemäß bindet der Antikörper direkt an eine Tumorzelle oder an Metastasen bzw. Mikrometastasen. Ein dadurch gebildeter Immunkomplex des Antikörpers ist Voraussetzung für die humoralen und zellulären Aktivitäten des Immunsystems, ausgedrückt durch eine „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC) und/oder

eine „complement dependent cytotoxicity“ (CDC) Effektorfunktion. Diese Effektorfunktionen werden mit Standardtests zum Nachweis der Funktionsblockierung, wie Rezeptorblockierung und Verhinderung der Adhäsion, bestimmt.

Hochaffine Antikörper sind erfindungsgemäß bevorzugt. Insbesondere werden Antikörper eingesetzt, die mit einer Affinität entsprechend einer Dissoziationskonstante unter einem Kd-Wert von 10^{-6} mol/l, vorzugsweise weniger als 10^{-7} mol/l, am meisten bevorzugt 10^{-8} mol/l oder weniger bindet.

Erfindungsgemäß zur passiven Immuntherapie eingesetzte Antikörper können zwar von einer nicht-humanen Spezies abgeleitet sein, wie etwa ein muriner Antikörper. Es wird jedoch erwartet, dass ein rekombinanter, chimärer, sowie ein mit murinen und menschlichen Bestandteilen kombinierter, humanisierter oder humaner Antikörper für die Verabreichung am Menschen besonders verträglich ist.

Zur aktiven Immunisierung von Krebspatienten werden erfindungsgemäß die Komponenten a) und/ oder b) in immunogener Form bzw. als Impfstoffe formuliert. Bevorzugt sind pharmazeutische Präparationen, welche einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthalten. Dieser umfasst beispielsweise Hilfsstoffe, Puffer, Salze, Konservierungsmittel. Die pharmazeutischen Präparationen können z. B. zur Prophylaxe und Therapie von Krebs-assoziierten Krankheitszuständen, wie der Metastasenbildung von Krebspatienten eingesetzt werden. Dabei werden in vivo oder auch ex vivo Antigen-präsentierende Zellen spezifisch moduliert, um die Immunantwort gegen die TAA zu generieren.

Zur aktiven Immunisierung mit den spezifischen Antigenen bzw. der Antigenkombination des erfindungsgemäßen Sets wird üblicherweise eine Impfstoff - Formulierung eingesetzt, die das Immunogen - sei es ein natürliches TAA oder dessen Epitop, Abbild (Mimik), oder ein immunogener Antikörper - zumeist nur in geringen Konzentrationen, etwa in einer immunogenen Menge im Bereich von 0.01 µg bis 10 mg enthält. Je nach Immunogenität des Impfantigens, die etwa durch speziesfremde Sequenzen oder Derivatisierung geprägt ist, aber auch je nach verwendeten Hilfsmitteln bzw. Adjuvantien, wird die geeignete immunogene Dosis gewählt, etwa im Bereich von

0.01 µg bis 750 µg, vorzugsweise 100 µg bis 500 µg. Ein Depot-Impfstoff, der an den Organismus über einen längeren Zeitraum abgegeben werden soll, kann aber auch weit höhere Mengen an Impfantigen enthalten, etwa mindestens 1 mg bis zu mehr als 10 mg.

Die Konzentration richtet sich nach der verabreichten Menge des flüssigen oder suspendierten Impfstoffes. Ein Impfstoff wird üblicherweise in Fertigspritzen oder Ampullen mit einem Volumen von 0.01 bis 1 ml, vorzugsweise 0.1 bis 0.75 ml, zur Verfügung gestellt.

Das Impfantigen einer Komponente des erfindungsgemäßen Sets wird vorzugsweise in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger präsentiert, der sich für die subkutane, intramuskuläre aber auch intradermale oder transdermale Administration eignet. Eine weitere Art der Verabreichung funktioniert über den mucosalen Weg, etwa die Vakzinierung durch nasale oder perorale Verabreichung. Wenn Feststoffe als Hilfsmittel für die Impfstoff-Formulierung herangezogen werden, wird etwa ein Adsorbat bzw. eine suspendierte Mischung des Antikörpers mit dem Hilfsmittel verabreicht. In besonderen Ausführungsformen wird der Impfstoff als Lösung bzw. Flüssigimpfstoff in einem wässrigen Lösungsmittel dargereicht.

Vorzugsweise werden Impfeinheiten einer Tumorstoffimpfung bereits in einer geeigneten Fertigspritze oder Ampulle zur Verfügung gestellt. Eine stabile Formulierung der Vakzine kann vorteilhafterweise in einer gebrauchsfertigen Form „ready-to-use“ in den Verkehr gebracht werden. Ein Gehalt an Konservierungsmittel, wie Thimerosal oder andere Konservierungsmittel mit verbesserter Verträglichkeit, ist zwar nicht notwendigerweise erforderlich, kann aber zur längeren Haltbarkeit bei Lagertemperaturen von Kühlschranktemperaturen bis zu Raumtemperatur in der Formulierung vorgesehen werden. Der erfindungsgemäße Impfstoff kann aber auch in gefrorener oder lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt werden, und bei Bedarf aufgetaut bzw. rekonstituiert werden.

Es hat sich bewährt, die Immunogenität eines erfindungsgemäß eingesetzten Antikörpers durch die Verwendung von Adjuvantien zu erhöhen. Dazu werden Feststoffe oder flüssige Vakzine-Adjuvantien eingesetzt, beispielsweise Aluminium-hydroxid (Alu-Gel) oder

-phosphat, Wachstumsfaktoren, Lymphokine, Zytokine, etwa IL-2, IL-12, GM-CSF, Gamma Interferon, oder Komplementfaktoren, wie C3d, weiter Liposomenbereitungen, aber auch Formulierungen mit zusätzlichen Antigenen, gegen die das Immunsystem bereits eine starke Immunantwort gemacht hat, wie Tetanus-Toxoid, Bakterielle Toxine, wie Pseudomonas-Exotoxine und Derivate von Lipid A.

Epitope der geeigneten Zielantigene imitieren oder umfassen vor allem Domänen eines natürlichen, homologen oder derivatisierten TAA. Diese sind zumindest durch ihre Primärstruktur und eventuell Sekundärstruktur mit den TAA vergleichbar. Die Epitope können sich aber auch von den TAA darin völlig unterscheiden, und rein durch die Ähnlichkeit von räumlichen (Tertiär-) Strukturen Bestandteile eines TAA, vor allem proteinärer bzw. Kohlenhydrat-Antigene nachahmen. Allein die Tertiärstruktur eines Moleküls kann somit ein Mimik bilden, das die Immunantwort gegen ein bestimmtes TAA hervorruft.

In einer besonderen Ausführungsform werden am erfindungsgemäß eingesetzten Antigen der Komponente a) zumindest zwei gleiche oder verschiedene Epitope eines Adhäsionsproteins, etwa eines homophilen zellulären Membranproteins, wie EpCAM, vorgesehen bzw. imitiert. Somit kann durch die aktive Immunisierung eine Vielzahl von Antikörpern mit Spezifität für dasselbe Molekül, aber unterschiedlicher EpCAM-Bindungsstellen generiert werden. Gleichermassen kann auch ein Epitop eines Antigen der Komponente b) an einem oder mehreren der Epitope des Adhäsionsproteins konjugiert sein. Ein entsprechend ausgebildetes „Kombinationsantigen“ umfasst somit zumindest ein Epitop, Fragment oder Molekül eines zellulären Adhäsionsproteins, wie EpCAM, und ein Epitop, Fragment oder Molekül einer aberranten Glykosilierung, wie Lewis Y, auf einem einzigen Träger. Ein solches Kombinationsantigen kann besonders gut die zellulären Tumorantigene nachahmen, und bewirkt dementsprechend die gewünschte Immunantwort gegen die epithelialen Tumorzellen.

Zur Impfstoff-Formulierung können auch weiter bekannte Verfahren zur Konjugierung oder Denaturierung von Impfstoff-Bestandteilen eingesetzt werden, um die Immunogenität des Wirkstoffes noch zu erhöhen. An erfindungsgemäß verwendeten Impfantigenen können zu-

sätzlich noch andere Stoffe kovalent gebunden sein, wie Peptide, Glycopeptide, Kohlenhydrate, Lipide oder Nukleinsäuren, aber auch ionische Gruppen, wie Phosphatgruppen, oder Trägermoleküle, wie Polyethylenglycol oder KLH. Diese Seitengruppen können unter Umständen selbst Epitope eines Tumor-assoziierten Antigens im Sinne der vorliegenden Erfindung repräsentieren. Ein Beispiel für ein konjugiertes Impfantigen ist der in der österreichischen Anmeldung A 744/2002 beschriebene immunogene Antikörper, der mit einer Lewis Y antigenen Struktur glykosiliert ist.

Im einem erfindungsgemäß eingesetzten Kombinationsantigen können die verschiedenen Epitop-Strukturen über einen Koppler miteinander verbunden sein. Dieser Koppler ist vorzugsweise ein kurzes bifunktionelles Molekül, wie z.B. N-Hydroxysuccinimid, Gleichwohl kann der Koppler auch durch eine größere chemische Verbindung als ein einfaches Kopplermolekül verwirklicht werden. Voraussetzung ist immer, dass dieser Koppler keinen negativen Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften des Konjugates hat, d.h., dass er selbst keine wesentliche Immunogenität auslöst. Ein Koppler kann erfindungsgemäß auch durch die chemische Umwandlung eines Teiles des Antikörpers bzw. der zu konjugierenden Struktur quasi "in situ" hergestellt werden. Dieser an der Epitopstruktur selbst hergestellte Koppler kann dann direkt zum jeweils anderen Bindungspartner konjugiert werden (z.B. über die Amingruppe des Lysins, über OH-Gruppen, Schwefelgruppen, etc.).

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Impfantigen auch in Form seiner entsprechenden Nukleinsäure zur Verfügung gestellt. Die Nukleinsäure kodiert für ein entsprechendes Epitop und kann gegebenenfalls direkt als „nackte“ Nukleinsäure verimpft werden, um eine Immunantwort gegen das Genprodukt in vivo zu induzieren.

Besondere Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Impfstoffes enthalten als Impfantigene insbesondere anti-idiotypische Antikörper, also ab₂, die gegen den idiotyp eines TAA-spezifischen Antikörper (ab₁) gerichtet sind. Antiidiotypische Antikörper provozieren in vivo die Bildung von ab₃ Antikörpern, die wiederum auch die TAA einer Tumorzelle erkennen, an diese binden und entsprechend lysieren. Beispielhaft wird ein anti-idiotypischer

Antikörper gegen Glykan-spezifische Antikörper eingesetzt, etwa ein anti-idiotypischer Antikörper, der den Idiotyp eines anti-Lewis Y Antikörpers erkennt, z.B. wie in der EP 0 644 947 beschrieben.

Diese erfindungsgemäß zur aktiven Impfung eingesetzten Antikörper werden nur in geringen Mengen verabreicht. So werden etwa keine besonderen Nebenwirkungen erwartet, auch wenn der erfindungsgemäße Antikörper von einer nicht-humanen Spezies abgeleitet ist, wie etwa ein muriner Antikörper. Es wird jedoch angenommen, dass ein rekombinanter, chimärer, sowie ein mit murinen und menschlichen Bestandteilen kombinierter, humanisierter oder humaner Antikörper für die Verabreichung am Menschen besonders verträglich ist. Andererseits kann ein muriner Anteil im erfindungsgemäßen Antikörper durch seine Fremdartigkeit die Immunantwort im Menschen noch zusätzlich provozieren.

Die Kombination der aktiven und/oder passiven Immuntherapie mit an sich bekannten adjuvanten Behandlungsmethoden ist durchaus üblich. Darunter finden sich Mittel zur Radiotherapie oder Chemotherapie, wie der Monotherapie oder Polytherapie. Aus Gründen der verschiedenen Wirkmechanismen wird die Immuntherapie vorzugsweise mit der Polychemotherapie kombiniert. Die Kombination der aktiven Immuntherapie eines Krebspatienten mit einer Chemotherapie ist beispielsweise in der österreichischen Anmeldung A 774/2002 beschrieben.

Bevorzugterweise für die Chemotherapie eingesetzte Mittel sind alkylierende pharmazeutische Präparationen. So sind etwa Mittel enthaltend Taxan, Anthracycline oder Platin bevorzugt. Alle üblichen Präparate, die für die verschiedenen Krebsbehandlungen zum Einsatz kommen, können weiter kombiniert werden. Die Chemotherapeutika werden üblicherweise intravenös oder peroral verabreicht.

Die erfindungsgemäße Behandlung umfasst sowohl prophylaktische als auch therapeutische Maßnahmen. Die Behandlung dient nicht nur der Humanmedizin, sondern kann auch für die Behandlung und/oder Diagnostik von Krebsformen verschiedener Säugetieren indiziert sein. Patienten mit Primärtumoren können gleichermaßen behandelt werden, wie Patienten mit Sekundärtumoren. Die Krebsbehandlung

zielt insbesondere auf die Behandlung der „minimal residual disease“ ab.

Ein mögliches Behandlungsziel ist die effektive Bindung und Reduktion von Tumorzellen, um deren Disseminierung möglichst zu verhindern. Gleichzeitig werden auch insbesondere die disseminierten Tumorzellen angegriffen. Die in Blut, Knochenmark oder Organen detektierbaren Tumorzellen bzw. der Mikrometastasen werden mit dem erfindungsgemäßen Set prophylaktisch verhindert und therapeutisch signifikant reduziert. Die Bildung von Metastasen soll dadurch verzögert, und deren Wachstum zumindest verlangsamt werden. Durch die erfindungsgemäße Immuntherapie kann also die rückfallsfreie Lebensspanne und damit auch die Gesamtüberlebenszeit der Patienten verlängert werden. Indikator für den Behandlungserfolg ist die signifikante Reduktion von Tumorzellen in Blut, Serum oder Knochenmark.

Das erfindungsgemäße Set der Antigene und/oder Antikörper dient auch zur immunologischen Bestimmung einer Krebserkrankung. Nachdem sich die genannten Zielantigene und die Kombination der Komponenten a) und b) als besonders aussagekräftig auf den weiteren Verlauf der Erkrankung und die Überlebenszeit erwiesen hat, können die Wirksubstanzen als diagnostisches Mittel herangezogen werden. Damit wird ein immunologisch aktives „panel“ zur Verfügung gestellt, welches zur Auswahl geeigneter diagnostischer Antikörper dient, oder direkt als Immunreagens zur Bestimmung von Tumorzellen solider Tumoren, von Metastasen, Mikrometastasen oder disseminierter Tumorzellen geeignet ist.

Für die diagnostische Bestimmung werden Proben von Tumorgewebe oder Körperflüssigkeiten, wie Blut oder Knochenmark, von Tumorpatienten entnommen. Diese Proben werden dann mit den Immunreagenzien entsprechend den Komponenten a) und b) des Sets versetzt. Eine eventuelle Immunreaktion ist indikativ für die Malignität der Erkrankung bzw. für den Krankheitsverlauf und eine bestimmte Prognose.

Kleine Tumoren oder eine Probe von Tumorgewebe werden üblicherweise durch Biopsie entnommen. Proben von Tumorgewebe werden auch durch die partielle oder vollständige Resektion solider Tumoren

erhalten. Aufgrund des entnommenen Tumorgewebes diagnostiziert dann ein Pathologe, ob das Gewebe von einem gutartigen oder bösartigen Tumor stammt. Eine Diagnose kann durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Immunhistochemie ergänzt oder als standardisierte Alternative angeboten werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren der immunologischen Bestimmung einer Krebserkrankung mit mindestens einer Auswahl von Immunreagenzien entsprechend den Komponenten a) und b) kann weiter für die Untersuchung von Proben aus peripherem Blut, Knochenmark oder Fraktionen derselben herangezogen werden. Die vorteilhafte Verwendung eines erfindungsgemäßen Sets betrifft dabei das Monitoring von Krebspatienten während einer Therapie. Dabei werden insbesondere Immunreagenzien für die Bestimmung eines Antikörpertiters gegen die Antigene der Komponenten a) und b) verwendet. Entsprechende Immunreagenzien werden aber auch für die qualitative oder besser quantitative Bestimmung von disseminierten Tumorzellen aus Körperflüssigkeiten eines Krebspatienten während einer Therapie eingesetzt. Die Reduktion der disseminierten Tumorzellen ist ein Indikator für die Wirksamkeit der Therapie.

Das Monitoring während einer Krebsbehandlung bedient sich vorzugsweise einer erfindungsgemäßen Kombination von Immunreagenzien, nicht nur für die Bestimmung eines entsprechenden Antikörpertiters im Blut der Patienten, sondern auch für die Bestimmung der Wirkung auf die Tumorzellen solider Tumore oder auf disseminierte Tumorzellen.

Blut- oder Serumproben eines Krebspatienten können mit einem erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel qualitativ und/oder quantitativ auf Immunkomplexe untersucht werden. Die Analysemethoden sind an sich übliche Analysemethoden mit Fraktionierung und Anreicherung der Immunkomplexe und/oder Immunreaktion mit einem spezifischen Antikörper, etwa gerichtet gegen den Fc-Teil eines zur Behandlung eingesetzten Antikörpers. Wenn der verwendete Antikörper murine Strukturen aufweist, kann dieser auch mit einem anti-murin Antikörper gebunden werden, im Sinne eines „capture“ Schrittes.

Eine Immunreaktion mit den erfindungsgemäß eingesetzten Immun-

reagenzien kann durch eine entsprechende Markierung eines der Bindungspartner aus dem Immunkomplex detektiert werden. Üblicherweise wird ein Immunreagens mit einer Markierung versehen. Eine weitere bevorzugte Variante des diagnostischen Mittels enthält zusätzlich noch ein Reagens, das mit dem eventuell gebildeten Immunkomplex reagiert. Diese Reaktion kann dann durch eine entsprechende Markierung sichtbar gemacht werden. Mittel zur Markierung von Immunreagenzien oder Reagenzien gegen Immunkomplexe sind dem Fachmann bekannt. Darunter sind fluoreszierende, chromogene Mittel, Radiomarkierungen („radiolabel“) oder Enzymmarkierungen.

Reagenzien für die Bestimmung der Komponenten a) und/oder b) bzw. für die Bestimmung von deren Reaktionsprodukte oder Immunkomplexe sind vorteilhafterweise an einem Träger immobilisiert. Geeignete Träger sind etwa präparierte Mikrotiterplatten, aber auch Träger, die für die Immunaффinitätschromatographie geeignet sind. Die Immunreagenzien sind vorteilhafterweise direkt an Säulenmaterialien gebunden und binden die relevanten Antigene oder Antikörper aus Körperflüssigkeiten für deren Bestimmung.

Ein bevorzugtes Material für das erfindungsgemäß eingesetzte diagnostische Mittel ist etwa immobilisiertes EpCAM, wobei ein rekombinantes EpCAM bevorzugt wird. Dieses Mittel wird dann etwa mit einem weiteren immobilisierten anti-idiotypischen Antikörper mit Spezifität für den Idiotyp eines Lewis Y-Antikörpers oder mit einem immobilisierten Lewis Y-Antigen kombiniert. Die bevorzugte Kombination ist die serielle oder parallele Reinigung von Immunreaktanden aus einer Körperflüssigkeit, etwa aus Serum, um diese zu quantifizieren.

Figur 1 zeigt die Coexpression von EpCAM und Lewis Y Antigenen auf Tumorgewebsproben von Brustkrebspatientinnen, sowie deren Korrelation mit der Überlebenszeit.

Im Folgenden wird die immunhistochemische Bestimmung von relevanten Antigenen auf Gewebeproben solider Tumoren beschrieben, sowie diagnostische Verfahren zum differenzierten Monitoring von immunspezifischen Tumormarkern. Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung weiter erläutern, aber nicht ein-

schränken.

1. Immunhistochemische Untersuchung von „Mikroarrays“

Gewebeproben solider Tumoren wurden gemäß der WO 0142796 als Mikrofelder („Microarrays“) präpariert, die mit Hilfe verschiedener Antikörperpräparationen immunhistochemisch untersucht wurden. Die bestimmten Antigenstrukturen der Mikroarrays wurden der Krankheitsgeschichte der Spender der Gewebeproben gegenübergestellt.

Als Antikörperpräparationen wurden die folgenden eingesetzt:

ESA (Novocastra) Maus monoklonaler anti-EpCAM Antikörper
BR55-2 (EP 0 285 059, ATCC HB 9324) Maus monoklonaler anti-Lewis Y Antikörper

Die Immunreaktion wurde durch Färbung mit einem Standard Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin System (Vector ABC-kit, Vector, PK-6100) mit Diaminobenzidase als Chromogen (DAB, Bio Genex, HK-130-5K) bestimmt.

Der Grad der Färbung wurde mit einem Punktesystem bewertet (0, 1+, 2+, 3+). Zusätzlich wurde der Anteil an positiven Zellen geschätzt. Die Tumorproben wurden entsprechend der Färbung und des Anteils der gefärbten Zellen folgendermaßen in Kategorien eingeteilt:

Negative: keine Färbung

Schwach: 1+ <70%, 2+ <20%

Moderat: 1+ ≥70%, 2+ ≥20% and <80%, 3+ <30%

Stark: 2+ ≥80%, 3+ ≥30%

A. Bestimmung der EpCAM-Expression auf Gewebeproben von Brustkrebs

Die Reaktion der Mikroarrays mit ESA war im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und mit dem Grad der Knotenbildung stärker ausgeprägt. Eine fehlende Färbung mit ESA korrelierte mit einer

guten Prognose. Es wurde gefunden, dass ESA bevorzugt an Proben neoplastischer Brusterkrankungen und Tumoren mit schlechter Prognose bindet. ESA bindet hingegen nur schwach an normalem Brustgewebe oder nicht-malignen Brusterkrankungen.

Tabelle 1: ESA Immunreaktion und Tumorstadium

Tumorstadium	N	ESA-Immunfärbung			
		Neg %	schwach %	moderat %	stark %
pT1	631	54,04	21,24%	14,58%	10,14%
pT2	856	43,57%	26,64%	14,37%	15,42%
pT3	106	42,45%	24,53%	16,98%	16,04%
pT4	212	47,64%	22,64%	15,09%	14,62%

p = .0078

N ... Anzahl der untersuchten Mikroarrays

Tabelle 2: ESA Immunreaktion und Tumorgrad

Tumorgrad	N	ESA-Immunfärbung			
		Neg %	schwach %	moderat %	stark %
G1	429	64,57%	20,51%	8,62%	6,29%
G2	693	52,67%	25,11%	13,85%	8,37%
G3	572	26,40%	26,75%	20,63%	26,22%

P < 0.0001

Tabelle 3: ESA Immunreaktion und Knotenstatus

Knotenstatus	N	ESA-Immunfärbung			
		Neg %	schwach %	moderat %	stark %
pN0	744	50,67%	20,97%	13,98%	14,38%
pN1	654	47,09%	25,38%	15,44%	12,08%
pN2	105	33,33%	27,62%	18,10%	20,95%

P = 0.0115

B. Bestimmung der Lewis Y-Expression auf Gewebeproben von Brustkrebs

Lewis Y wird auf verschiedenen Proben von normalem Gewebe und Gewebe von neoplastischen Brusterkrankungen exprimiert. Die Reaktion der Mikroarrays mit BR55-2 war mit fortgeschrittenem Tumorgrad stärker ausgeprägt, korrelierte jedoch nicht mit dem Knotenstatus und Tumorstadium.

Tabelle 4: BR55-2 Immunreaktion und Tumorstadium

Tumorstadium	N	Lewis Y-Immunfärbung			
		Neg %	schwach %	moderat %	stark %
PT1	597	20,44%	30,15%	32,66%	16,75%
PT2	834	20,62%	31,65%	34,77%	12,95%
PT3	95	12,63%	35,79%	41,05%	10,53%
PT4	206	20,39%	34,95%	31,07%	13,59%

p = 0.2486

Tabelle 5: BR55-2 Immunreaktion und Tumorgrad

Tumorgrad	N	Lewis Y-Immunfärbung			
		Neg %	schwach %	moderat %	stark %
G1	412	24,76%	24,03%	34,71%	16,50%
G2	652	19,94%	31,90%	36,50%	11,66%
G3	552	16,85%	38,22%	29,53%	15,40%

P < 0.0001

Tabelle 6: BR55-2 Immunreaktion und Knotenstatus

Knotenstatus	N	Lewis Y-Immunfärbung			
		Neg %	schwach %	moderat %	stark %
PN0	713	21,04%	29,31%	34,92%	14,73%
PN1	629	20,67%	33,39%	31,64%	14,31%

PN2	99	13,13%	39,39%	34,34%	13,13%
-----	----	--------	--------	--------	--------

p = 0.2621

C. Bestimmung der EpCAM und Lewis Y-Coexpression auf Gewebeproben von Brustkrebs

Die Coexpression von EpCAM und Lewis Y- Antigen auf Brustkrebsgewebe wird in vielen Fällen gefunden. Die Wahrscheinlichkeit für die EpCAM spezifische Immunfärbung nimmt dabei mit der Färbeintensität der Lewis Y Immunfärbung zu. Die Coexpression ist vor allem bei hochgradigen Tumoren häufig, jedoch kaum mit dem Tumorstadium oder Knotenstadium assoziiert.

Die Prognose für die Überlebenszeit der Krebspatienten ist eindeutig verschlechtert, wenn beide Antigene exprimiert werden ($p < 0.0001$), siehe dazu die Figur 1.

Tabelle 7: ESA und BR55-2 Immunreaktion und Tumorstadium

Tumorstadium	N	ESA-Immunfärbung			
		Neg %	Lewis Y %	EpCam %	beide pos %
PT1	568	41,73%	32,92%	10,92%	14,44%
PT2	799	39,55%	29,66%	15,64%	15,14%
PT3	93	38,71%	24,73%	16,13%	20,43%
PT4	202	36,63%	33,17%	14,85%	15,35%

p = 0.2482

Tabelle 8: ESA und BR55-2 Immunreaktion und Tumorgrad

Tumorgrad	N	ESA-Immunfärbung			
		Neg %	Lewis Y %	EpCam %	beide pos %
G1	393	50,38%	34,10%	8,91%	6,62%
G2	627	44,66%	32,06%	11,32%	11,96%
G3	536	25,19%	27,24%	21,46%	26,12%

$p < 0.0001$

Tabelle 8: ESA und BR55-2 Immunreaktion und Knotenstatus

Knotenstatus	N	ESA-Immunfärbung			
		Neg %	Lewis Y %	EpCam %	beide pos %
PN0	679	42,56%	27,98%	13,70%	15,76%
PN1	605	38,84%	32,56%	13,06%	15,54%
PN2	98	30,61%	30,61%	16,33%	22,45%

P = 0.1746

2. Monitoring der Immunantwort auf eine aktive Immunisierung

Während einer Studie zur aktiven Immunisierung von Rhesusaffen mit einem Impfstoff auf Basis eines HE2-Lewis Y-Neoglykoproteins (HE2LeY), hergestellt gemäß der österreichischen Anmeldung A744/2002, wurde der Erfolg der Immunisierung anhand der spezifischen Immunantwort bestimmt.

Es wurde ein diagnostisches Mittel eingesetzt, um den Titer von anti-EpCAM Antikörpern und anti-Lewis Y-Antikörpern über die sequenzielle Immunaффinitätschromatographie zu bestimmen. Die Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe eines FPLC Systems vorgenommen. 1 ml Serum wurde 1:10 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung verdünnt und auf die erste Säule aufgebracht. Die gebundene Fraktion wurde durch Elution mit einem Glycin-Puffer oder mit Ammonium gewonnen, und eventuell auf eine zweite Säule aufgebracht. Der Immunglobulingehalt der EpCAM- und Lewis Y-Frak-tionen wurde quantitativ bestimmt.

Die folgenden Säulenmaterialien wurden für die diagnostische Bestimmung eingesetzt:

- 1.EpCAM-Sepharose: rekombinantes EpCAM gebunden an eine CH-Sepharose 4B Säule
- 2.SynsorbY: Lewis Y gebunden an eine chromo sorb Matrix (Fa. Synsorb)
- 3.HE2LeY-Sepharose: HE2LeY gebunden an eine CH-Sepharose 4B column

Die Säulen 1 und 2 wurden sowohl als alleinige diagnostische Mittel als auch in Serie eingesetzt.

3. Bestimmung disseminierter Tumorzellen aus peripherem Blut

Disseminierte Tumorzellen wurden aus den Blutproben von Tumorpatienten folgendermaßen bestimmt.

A. Tumorzell-Anreicherung:

25 ml peripheres Blut wurden bei 1600 x g 20 min bei 4°C in einem OncoQuick® Röhrchen (Greiner bio-one, Altmünster, Österreich) zentrifugiert. Die Tumorzellen enthaltende Phase wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen übergeführt und ein Zell-pellet durch Zentrifugieren gewonnen. Dieses Pellet wurde resuspendiert. Der zelluläre Anteil der Suspension wurde auf einen Objektträger für mikroskopische Untersuchung zentrifugiert. Der Objektträger wurde bei -20°C bis zur Auswertung gelagert.

B. Tumorzell-Bestimmung

Auf den Objektträger mit den isolierten und angereicherten Tumorzellen wurde eine Lösung mit fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die durch die Antikörperbindung markierten Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan Zeiss, Jena, Deutschland) sichtbar gemacht und ausgezählt. Der Gehalt an Tumorzellen in Blut wurde dann entsprechend dem Anreicherungsfaktor kalkuliert. Die Methode wurde mit Standard Tumorzell-Suspensionen validiert.

Als markierte spezifische Antikörper werden IGN311, ein humanisierter monoklonaler anti-Lewis Y Antikörper, hergestellt gemäß der EP 528 767, und HEA-FITC (Anti-EpCAM, Miltenyi, Klon HEA125), beide mit fluoreszierenden Proteinen konjugiert, eingesetzt.

Die Wirksamkeit der immuntherapeutischen Behandlung von Krebspatienten wird durch den Nachweis der Tumorzellen in peripherem Blut nachgewiesen. Die Reaktion von detektierten Tumorzellen mit

einem der beiden Antikörpern oder mit beiden Antikörpern wird im Rahmen des Monitorings differenziert ausgewertet.

4. Selektion von Antikörpern mit Spezifität für ein Neoepitop

BALB/c Mäuse werden zuerst intraperitoneal und 4 Wochen später intravenös mit Zellen der SKBR3 Brustkrebszelllinie immunisiert. Milzzellen werden mit geeigneten Melanomzellen fusioniert und Hybridoma hergestellt. Die daraus erhältlichen monoklonalen Antikörper werden auf ihre Spezifität mit einem Differentialscreening-Verfahren untersucht. Die entsprechenden positiven Klone werden zur Produktion der Neoepitop-spezifischen monoklonalen Antikörper eingesetzt, um Antikörperpräparationen für die immuntherapeutische Behandlung von Tumorpatienten herzustellen.

Das Differentialscreening wird mit folgenden Antigenen konsekutiv vorgenommen:

- A. LewisY-Her-2/neu Rezeptor (SKBR3 Zellmembranextrakt auf Western-Blot)
- B. Lewis Y (synthetisch, Synthesom)
- C. Her-2/neu Rezeptor, rekombinant

Die Neoepitop-Antikörper binden lediglich an das Antigen A. nicht aber an die Antigene A oder B.

Patentansprüche:

1. Set zur kombinierten Anwendung für die Behandlung von Krebspatienten, welches die folgenden Komponenten umfasst
 - a) ein Antigen eines zellulären Oberflächenproteins, oder einen Antikörper gerichtet gegen das zelluläre Oberflächenprotein, und
 - b) ein Antigen einer aberranten Glykosilierung, oder einen Antikörper gerichtet gegen die aberrante Glykosilierung.
2. Set nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Komponenten a) und b) in jeweils einer oder einer einzigen pharmazeutischen Präparation geeignet zur Immuntherapie enthalten sind.
3. Set nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Präparation als Vakzine formuliert ist.
4. Set nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Präparation als intravenös verträgliches Produkt formuliert ist.
5. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen der Komponente a) ein Epitop eines zellulären Adhäsionsproteins, insbesondere eines Proteins ausgewählt aus der Gruppe der EpCAM, NCAM und CEA darstellt.
6. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen der Komponente a) ein Epitop eines Oberflächenrezeptors, insbesondere eines Rezeptormoleküls ausgewählt aus der Gruppe der EGF-Rezeptorfamilie, CD55-Rezeptor, Transferinrezeptor und P-Glycoprotein.
7. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen der Komponente b) ein Epitop eines Kohlenhydrats ausgewählt aus der Gruppe der Lewis-Antigene, insbesondere Lewis y und/oder Lewis b, Sialyl-Tn und Globo H darstellt.
8. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen der Komponente a) ein Epitop des EpCAM Mo-

leküls oder des Her-2/neu Rezeptors, und das Antigen der Komponente b) ein Epitop des Lewis Y Moleküls darstellt.

9. Verwendung eines Sets nach Anspruch 1 zur Herstellung eines diagnostischen Mittels zur immunologischen Bestimmung einer Krebserkrankung.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung im Rahmen der Behandlung von Krebspatienten vorgenommen wird.

11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass Tumorzellen eines soliden Tumors oder disseminierte Tumorzellen bestimmt werden.

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Tumorzellen aus Proben von peripherem Blut oder Knochenmark bestimmt werden.

13. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass ein Antikörpertiter gegen die Antigene der Komponenten bestimmt wird.

14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung zum Monitoring einer Behandlung des Krebspatienten vorgenommen wird.

15. Verfahren zur immunologischen Selektion eines Tumor spezifischen Zielantigens oder von Antikörpern gerichtet gegen das Zielantigen unter Verwendung eines Sets nach Anspruch 1.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass ein Neoepitop ausgewählt wird, das durch die Glykosilierung eines Antigens der Komponente a) mit einem Antigen der Komponente b) gebildet wird.

17. Präparation eines Antigens, welches ein Neoepitop oder dessen Mimik aufweist, erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 16.

18. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass ein Antikörper gerichtet gegen das Neoepitop unter Verwendung eines Sets nach Anspruch 1 ausgewählt und hergestellt wird.

19. Präparation eines Antikörpers mit einer Spezifität für ein Neoepitop, erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 18.

20. Diagnostisches Mittel auf Basis eines Sets nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Reagens zur Bestimmung einer Immunreaktion mit den Komponenten a) und b), oder mit Antikörper gegen diese enthält.

21. Mittel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagens mit einem fluoreszierenden Mittel, einem Chromogen, einem Radiolabel oder einem Enzym markiert ist.

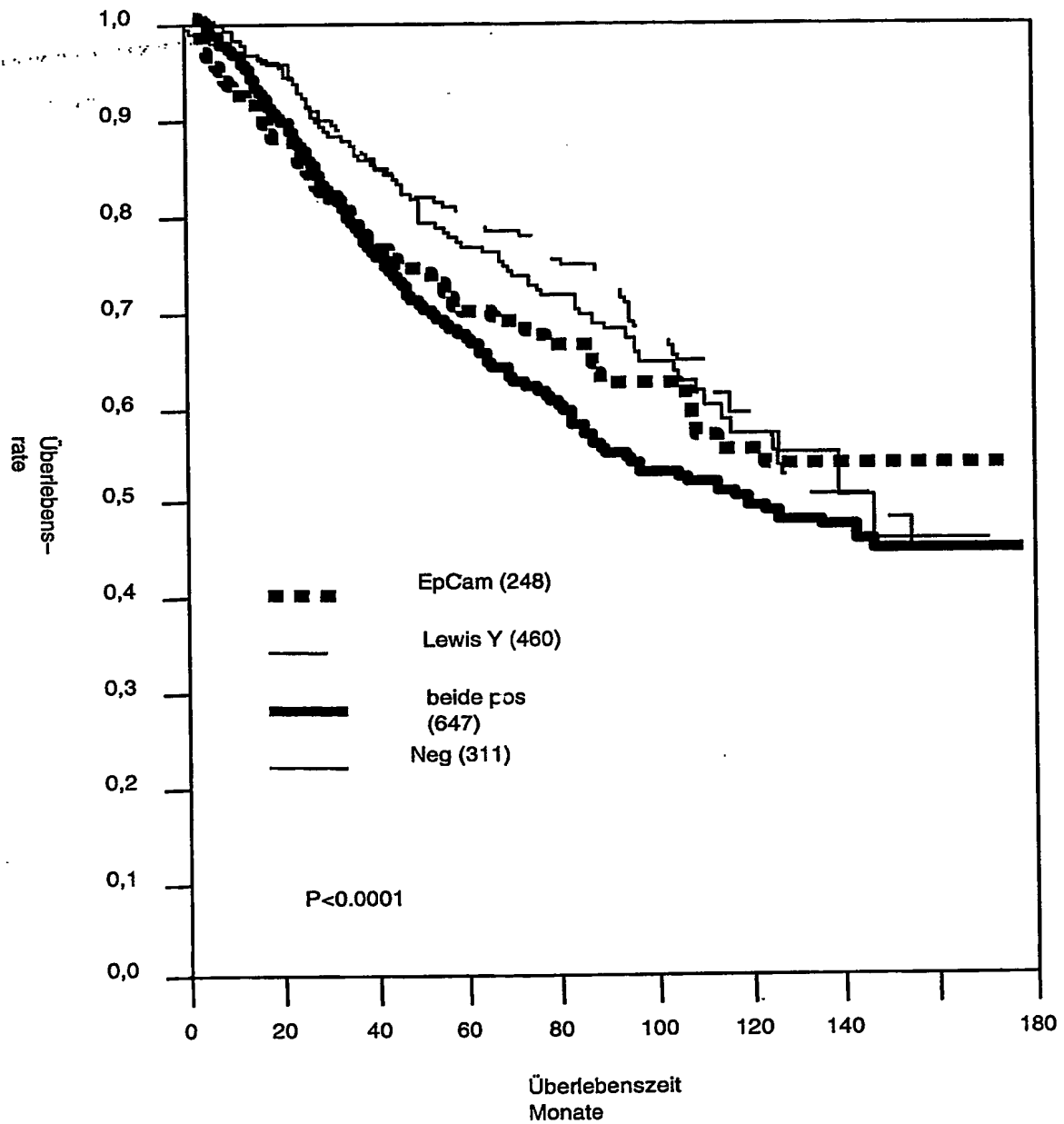
22. Mittel nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagens an einem Träger immobilisiert ist.

23. Mittel nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine Matrix zur Immunaффinitätschromatographie ist.

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Set zur kombinierten Anwendung für die Behandlung von Krebspatienten, welches eine Antigen eines zellulären Oberflächenprotein oder einen Antikörper gerichtet gegen das zelluläre Oberflächenprotein, und ein Antigen einer aberranten Glykosilierung oder einen Antikörper gerichtet gegen die aberrante Glykosilierung umfasst. Diese Set ist sowohl für die immuntherapeutische als auch diagnostische Anwendung bestimmt. Die Erfindung betrifft weiter ein Selektionsverfahren zur Auswahl von geeigneten Tumor-spezifischen Antigenen unter Zuhilfenahme dieses Sets und entsprechende spezifische Antikörperpräparationen.

Figur 1:



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ ~~LINES~~ OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.